

# 普通野生稻胚性细胞悬浮系的建立及原生质体再生植株

张 伟 简玉瑜

(实验中心遗传工程研究室)

**摘要** 广西普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 2 个品种的成熟种子经  $54\pm 1^{\circ}\text{C}$  温度处理 5 d 打破休眠后, 诱导产生愈伤组织。挑选胚性愈伤组织置于液体培养基中振荡培养。经 6 个月继代培养, 建立起胚性细胞悬浮系。其中 1 个品种 (No.40) 的悬浮细胞经酶解游离获得大量原生质体, 用琼脂糖包埋培养, 2 周内分裂频率达 21.4%。形成的小愈伤组织经增殖后在分化培养基上再生出绿色小植株。

**关键词** 普通野生稻; 悬浮培养; 原生质体; 植株再生

野生稻与栽培稻同属稻属, 是一个重要种质来源。与栽培稻相比, 野生稻具有抗病虫害、抗寒等抗逆性以及高蛋白质含量的优良品质; 而且还表现出特强的再生能力及繁茂性<sup>[4]</sup>。我国拥有比较丰富的野生稻资源<sup>[1]</sup>, 充分利用这一资源, 应用植物遗传操作技术, 将野生稻的优良特性引入栽培稻, 对于栽培稻的品种改良具有重要意义。在这一工作中, 栽培稻与野生稻的体细胞杂交技术提供了一条新的重要途径<sup>[11]</sup>。开展体细胞杂交研究的基础是原生质体再生植株, 栽培稻原生质体再生植株在近年已有重大突破和发展<sup>[2,3,5,6,8,13,14]</sup>; 但野生稻方面报道很少<sup>[9]</sup>。我们采用我国广西普通野生稻, 建立了胚性细胞悬浮系, 并进行原生质体游离培养获得了再生植株。

## 1 材料与方法

1.1 愈伤组织的诱导 采用采自广西钦州的普通野生稻 (No. 40) 与多年生普通野生稻 (68-w172) 2 种野生稻\* 的健康完整种子, 在  $54\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 黑暗条件下处理 5 d, 去掉种皮, 经表面消毒后, 置于  $\text{N}_6\text{A}$  培养基上,  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下培养。3~4 周后诱导产生的愈伤组织转至  $\text{N}_6\text{B}$  培养基上, 每隔 3~4 周进行继代培养。

1.2 胚性细胞悬浮系的建立 取继代第 2~3 周, 生长迅速、颜色鲜艳呈黄白色、颗粒细小、质地致密、结合松散的愈伤组织团块置于液体培养基  $\text{AA}^{[10]}$  中, 进行振荡培养, 转速 100 r/min, 温度  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 黑暗条件, 每隔 5~7 d 进行继代培养, 继代培养时间 6 个月以上。

1.3 原生质体游离与培养 从普通野生稻 (No. 40) 已建立的胚性细胞悬浮系中, 取继代第 4 天 1 ml 压紧细胞体积 (PCV packed cell volume) 的悬浮细胞放在  $\varnothing 6\text{ cm}$  培养皿中, 加

1991-06-01 收稿

\* 农学系何远康副教授提供种子。

入 10 ml 混合酶液 (Cellulase Onozuka RS 2%, Cellulase Onozuka R-10 1%, Macerozyme R-10 0.5%, Pectolyase Y-23 0.1%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7 mmol/L, 甘露醇 0.5 mol/L, pH=5.7),  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 黑暗条件下, 先经过转速 50 r/min 振荡处理 6 h, 后静止 10 h。游离获得的原生质体经三层筛网 (孔径分别为 61  $\mu\text{m}$ 、45  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$ ) 过滤后, 转速 800 r/min 离心收集, 先后用等渗的原生质体洗液及 KPR 液体培养基各清洗纯化 2 次。用 KPR 重新悬浮后, 于  $45^\circ\text{C}$  水浴中热激 5 min 处理, 再在  $0^\circ\text{C}$  冰浴中 10 sec 处理。最后以 1.5 ml 含 0.8% 低熔点琼脂糖 (Type VI Sigma) 的 KPR<sup>[12]</sup> 培养基包埋接于  $\varnothing 3.5$  cm 的培养皿中, 密度为  $1 \sim 2 \times 10^6$  个/ml, 在  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 黑暗条件下培养。用倒置显微镜观察并统计分裂频率。统计方法: 再生细胞分裂频率 = (观察分裂细胞数总和 / 观察细胞数总和)  $\times 100\%$ 。

2~3 周后, 琼脂糖包埋块经分割后置于含 0.25 mol/L 葡萄糖的低渗 KPR 液体培养基中培养, 待长出肉眼可见的小愈伤组织后, 转于  $\text{N}_6\text{C}$  培养基上进行愈伤组织增殖培养, 温度  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 黑暗。

1.4 植株再生 将直径 5 mm 左右的愈伤组织块置于  $\text{N}_6\text{D}$  培养基上进行分化培养, 14 h 光照/10 h 黑暗,  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

培养基成分组成 (mg/L)

培养基成分	$\text{N}_6\text{A}$	$\text{N}_6\text{B}$	$\text{N}_6\text{C}$	$\text{N}_6\text{D}$
大量元素				
微量元素				
维生素	同 $\text{N}_6^{[7]}$	同 $\text{N}_6^{[7]}$	同 $\text{N}_6^{[7]}$	同 $\text{N}_6^{[7]}$
肌醇				
蔗糖				
谷氨酰胺	—	—	100	250
水解乳蛋白	—	—	200	300
ABA	—	—	0.5	—
2,4-D	2	4	0.5	—
KT	—	—	—	2
IAA	—	—	—	0.1~0.5
6-BA	—	—	0.5	—
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

## 2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的诱导 2 种普通野生稻的种子不经高温处理, 不能发芽。经过  $54 \pm 1^\circ\text{C}$  高温处理 5 d 后, 所接种子发芽率为 100%。2~3 周后在  $\text{N}_6\text{A}$  培养基上产生出愈伤组织。结果表明, 普通野生稻种子存在休眠期, 适当的高温处理可以打破休眠, 有利于种子萌发诱导产生愈伤组织。

2,4-D 对于从普通野生稻成熟种胚诱导产生愈伤组织起主要作用, 但 2,4-D 浓度太低 ( $< 1\text{mg/L}$ ) 容易产生非胚性愈伤组织, 不利于后期建立胚性细胞悬浮系; 2,4-D 浓度

过高( $>8\text{mg/L}$ ),培养时间太长则容易减缓愈伤组织生长,引起愈伤组织褐化。愈伤组织诱导初期(第1,2次继代),较低的2,4-D浓度( $2\text{mg/L}$ )的 $\text{N}_6\text{A}$ 培养基比较适当;而较高2,4-D浓度( $4\text{mg/L}$ )的 $\text{N}_6\text{B}$ 培养基有利于胚性愈伤组织的快速增长,能抑制非胚性愈伤组织的生长。

2.2 胚性细胞悬浮系的建立 诱导产生的愈伤组织表现出不同类型。一类松软或呈粘胶状且生长缓慢;一类团块结构紧密、多根状突起。上述两类愈伤组织均不利于胚性细胞悬浮系的建立。另一类颗粒细小、致密而结合松散、颜色鲜艳呈黄白色、生长迅速,表现出胚性愈伤组织特有形态。把这类愈伤组织置于液体培养基AA中培养后,经过6个月继代,细胞团块颗粒逐渐变小、分散、密度增大;1周内PCV呈加倍增长;细胞团由50~500个细胞组成;细胞结合紧密;极少长形及不规则形细胞。形成稳定的生长状态(图版1)。从而建立胚性细胞悬浮系。选择生长迅速的胚性愈伤组织是建立胚性细胞悬浮系的关键。其中,较高的起始密度有助于悬浮细胞的迅速增长;氨基酸含量丰富的AA培养基有利于蛋白质合成旺盛的胚性细胞的生长;悬浮细胞在第3~4d增长最快,继代时间以5~7d为宜。

2.3 原生质体游离与培养 从胚性细胞悬浮系的悬浮细胞游离获得大量原生质体,经纯化后表现为圆形,内含物丰富(图版2)。包埋培养后第3~4d出现细胞第一次分裂(图版3),2周后统计分裂频率达21.4%。3周后形成多细胞团(图版4)。在含 $0.25\text{mol/L}$ 葡萄糖的低渗KPR液体培养基中保持旺盛分裂和生长,形成肉眼可见的小愈伤组织,转移到 $\text{N}_6\text{C}$ 培养上迅速生长(图版5),并形成紧实致密的团块。在这一过程中,表现出:(1)胚性细胞悬浮系是获得大量高活力原生质体的基础。游离原生质体的悬浮细胞以继代后第4d为好。悬浮细胞表现为形小均匀近圆形,细胞质浓密,细胞团较小,结构紧密,极少长形细胞。(2)混合酶液中,与栽培稻比较,增加Cellulase Onozuka R-10和Macerozyme R-10有助于提高游离的原生质体数量和质量。(3)酶解过程中,振荡强度过大、时间过长,可能引起原生质体破裂或自发融合,不利于后期细胞生长分裂。以初期短时间轻微振荡,有利于充分酶解和细胞分散,后期静止,从而获得高质量的原生质体。(4)与栽培稻相比,普通野生稻原生质体需要较高的培养密度,栽培稻一般为 $3\sim5\times10^5$ 个/ml的密度,野生稻则以 $1\sim2\times10^6$ 个/ml的密度为宜。低密度下无法持续分裂。(5)培养基渗透压以 $0.4\text{mol/L}$ 葡萄糖为最佳。过低容易引起破裂,过高则不利于分裂。(6)培养3周后,原生质体再生的细胞团在较低渗透压的培养基中表现出旺盛的生长,这与栽培稻等其它植物原生质体培养的结果相同。(7)小愈伤组织在增殖培养基 $\text{N}_6\text{C}$ 上大量增殖。较低浓度的生长素有利于保持愈伤组织的增殖生长,ABA及谷氨酰胺等有助于愈伤组织形成胚性结构,有利于后期植株的分化。

2.4 植株再生 愈伤组织转入分化培养基2~3周后出现绿点,进一步形成幼苗。 $0.1\sim0.5\text{mg/L}$ 的IAA与 $2\text{mg/L}$ KT有利于植株再生;KT浓度大于 $2\text{mg/L}$ 和不加IAA使非胚性愈伤组织容易快速生长,不利于植株分化与再生。 $1\text{cm}$ 长的幼苗移于 $1/2\text{N}_6+2\text{mg/LIAA}$ 培养基上,顺利生根,形成完整的绿色小植株(图版6)。

## 参 考 文 献

- 1 广东农林学院农学系. 我国野生稻的种类及其地理分布. 遗传学报, 1975, 2 (1): 31~35
- 2 王光远等. 水稻原生质体再生成熟植株. 实验生物学报, 1987, 20: 253~257
- 3 孙宝林等. 籼稻原生质体高频分裂及植株再生. 科学通报, 1989, 15: 1177~1179
- 4 吴妙棠等. 野生稻遗传资源利用展望. 作物品种资源, 1986, 4: 1~4
- 5 雷鸣等. 水稻原生质体的植株再生. 科学通报, 1986, 32: 1428~1430
- 6 Abdullah R, et al. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. bio/Technology 1986, 4: 1087~1090
- 7 Chu CC, et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experimentation on nitrogen sources. Sci Sin, 1975, 18: 659~668
- 8 Fujimura J, et al. Regeneration of rice plants from protoplasts. Plant Tiss Cult Lett, 1986, 2: 74~75
- 9 Koh-ichi Mori, Plant regeneration from protoplasts in wild *Oryza* species. Rice Genet Newsl, 1991, 7: 136~138
- 10 Muller AJ, et al. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase, Mol Gen Genet, 1978, 161: 67~76
- 11 Terada R, et al. Plantlet regeneration from somatic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and barnyard grass (*Echinochloa oryzicola* Vasing), Mol Gen Genet, 1987, 210: 39~43
- 12 Thompson JA, et al. Protoplast culture of rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose, Plant Sci, 1986, 47: 123~133
- 13 Toriyama K, et al. Cell suspension and protoplast culture in Rice, Plant Sci, 1985, 41: 179~183
- 14 Yamada Y, et al. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice. (*Oryza sativa* L.), Plant Cell Reports, 1986, 5: 85~88

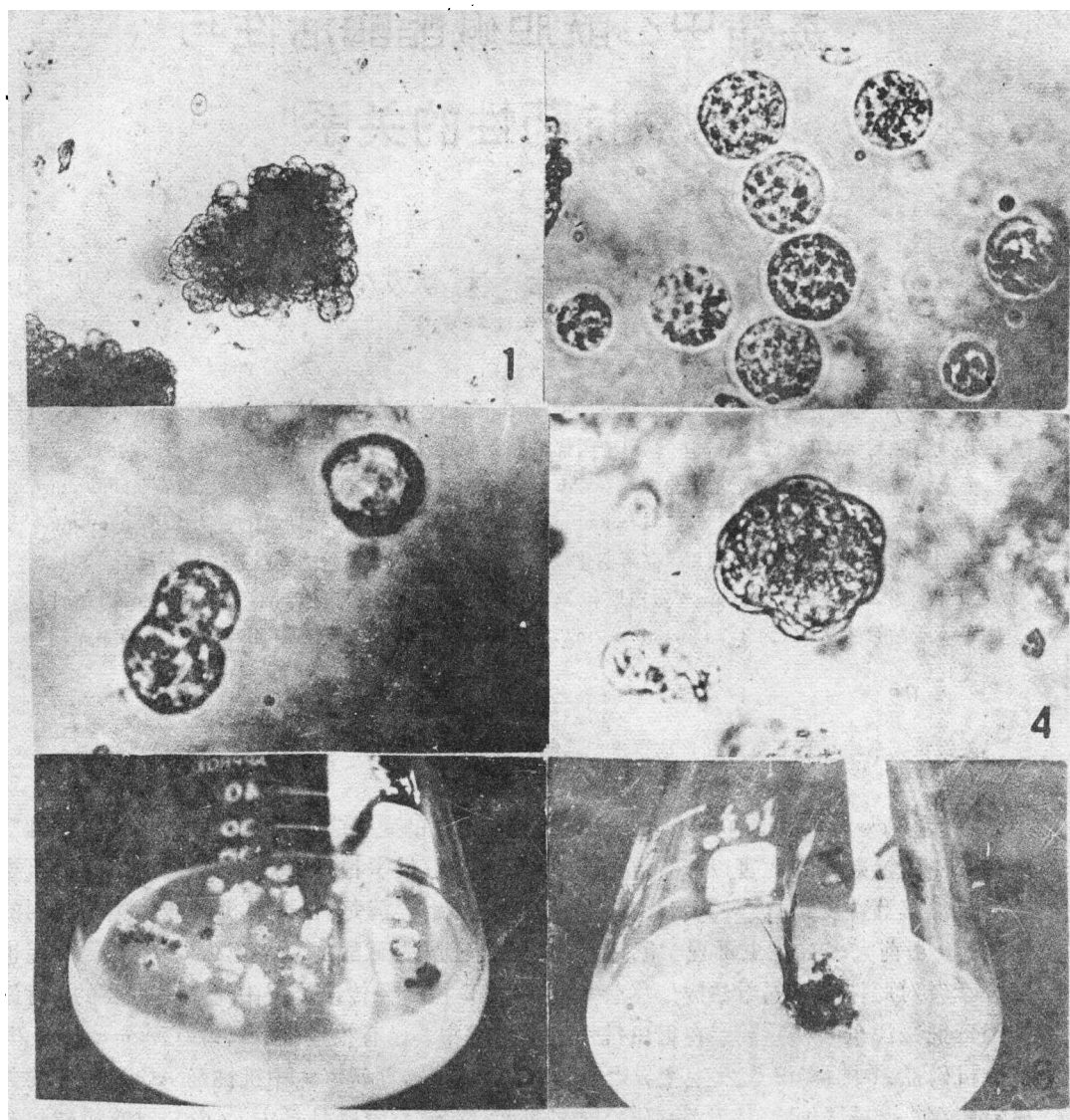
**ESTABLISHMENT OF EMBRYOGENIC CELL SUSPENSION CULTURES AND  
PLANT REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF WILD RICE (*ORYZA RUFIPOGON*)**

Zhang Wei     Jian Yuyu

(Genetic Engineering Laboratory, Experimental Center)

**Abstract** Calli were derived from the seeds of Guangxi wild rice (*Oryza rufipogon*) No. 40 and 68—w172 their dormancy being broken by heat treatment ( $54 \pm 1^\circ\text{C}$ , for 5 days). Suspension cell cultures were established by selecting embryogenic calli and culturing them in liquid medium on shaker for six months. High yield protoplasts were isolated from the suspension—culture cells of the wild rice No. 40 and imbedded in agarose to grow. After two weeks, the division frequency rose to 21.4%. Small callus clumps derived from protoplasts were transferred onto regeneration medium and from then green plantlets were obtained.

**Key words** Common wild rice; Suspension culture; Protoplast; Plantlet regeneration



图版 1 胚性细胞悬浮系细胞团  $\times 10 \times 10 \times 3$   
 2 游离的原生质体  $\times 40 \times 10 \times 3$   
 3 原生质体再生细胞第一次分裂  $\times 40 \times 10 \times 3$   
 4 原生质体再生多细胞团  $\times 40 \times 10 \times 3$   
 5 原生质体再生愈伤组织  
 6 原生质体再生植株